

<平成 20 年度助成>

アレルギーを予防する粉ミルクの開発に向けての基礎研究

中尾 篤 人

(山梨大学大学院医学工学総合研究部)

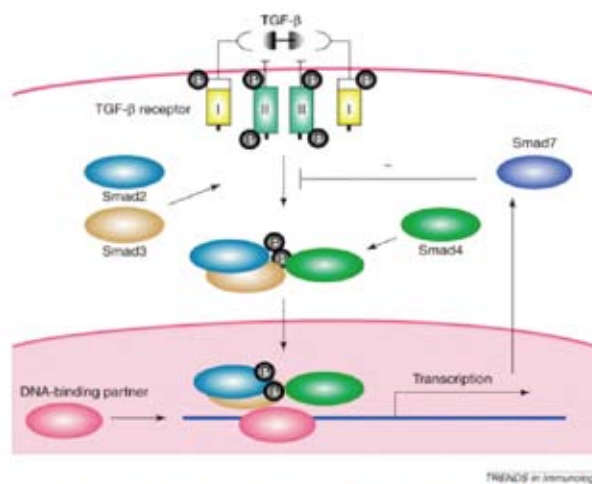
1. 緒 言 (研究の背景と目的)

形質転換増殖因子ベータ (transforming growth factor [TGF]- β 、以下 TGF- β) は、多彩な機能をもつサイトカインとして知られており、細胞増殖、アポトーシス、分化、細胞外マトリックス産生等の制御作用を介して、癌や線維化、免疫、発生など幅広く生命現象一般に関与している。細胞の種類や分化段階などに応じ、あまりに多彩な作用を TGF- β がもつため、このようなバラエティーに富んだ作用がいったいどのようにして惹起されるのかということがこの分野の最大の関心事であった。しかしながら 1996-97 年にかけて、TGF- β の主要な細胞内シグナル伝達経路である Smad 経路が同定されて以来、この多彩な作用の基礎となる分子メカニ

ムが次々と明らかにされつつある。現在では、Smad 経路を中心として、さらに細胞内で数多くのシグナル促進因子、抑制因子が時間的/空間的に協調することによって、ある特定の細胞における TGF- β シグナルの最終的なアウトプットが規定されると考えられている (図 1 参照)。

免疫系では、特に制御性 T 細胞の分化や機能を制御することによって免疫寛容状態の維持に TGF- β は関与している¹⁾。実際、TGF- β の欠損マウスは生後 4 週頃から自己免疫疾患様の激しい炎症が全身の臓器に惹起され死亡する。この知見は、TGF- β は免疫系が自己抗原やアレルゲンなどによって過剰に活性化されることを防いでいる強力な生理的因子であることを強く示唆している。

食物アレルギーは、“原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状



Nakao A. Trends Immunol 22:115, 2001

図 1 TGF- β の細胞内シグナル伝達経路

TGF- β が細胞膜上の受容体に結合すると受容体が活性化し、細胞内の Smad2 および Smad3 がリン酸化され Smad4 と複合体を形成し核内へ移行し、種々の転写因子と協調し標的遺伝子を活性化する。TGF- β 自身および TGF- β シグナルを抑制する Smad7 分子は標的遺伝子の 1 つであり、本研究中では TGF- β シグナルの活性化の指標として用いている。

(蕁麻疹、湿疹、呼吸困難、下痢、腹痛、アナフィラキシーショックなど)が惹起される現象”と定義される。原因食物摂取後すぐ発症するIgE依存性の反応と、数時間以上経ってから症状の現れるIgE非依存性、Th2細胞依存性の反応が存在する。治療は原因食物の除去が基本であり、いまだ有効な治療法は確立されていない。

食物アレルギーは、特に1歳までに発症頻度が最も高く(約6.8%)、成人においては1-4%である。小児例のほとんどは自然緩解すると報告されているが、食物アレルギーはアナフィラキシーショックの最も多い原因であり、その約5%は致命的な経過をとるため、大きな問題となっている。したがって、食物アレルギーに対する有効な予防や治療法を見いだすことは、医学的にだけでなく社会的な意義も大きい。

一方、世界保健機関(WHO)は、乳幼児のアレルギー疾患(主には食物アレルギーに起因する乳幼児アトピー性皮膚炎と思われる)の予防に、母乳栄養を推奨している。母乳がどうして食物アレルギーやその他のアレルギー疾患(喘息やアトピー性皮膚炎)の発症を減少させるのかについては未だよく理解されてはいないが、近年、母乳中に存在するTGF- β が、予防の鍵となる重要な因子であるというヒトにおける疫学的報告が相次いでいる²⁾。

しかしながら、タンパク質であるTGF- β が経口摂取された場合に、胃酸や消化酵素などによる分解を免れてその生理活性を保てるのか?さらには実際に免疫系に影響を与えることができるのか?という基本的な問題が未解決であり、母乳中TGF- β とアレルギー疾患に関する疫学研究は実証的な根拠に欠けていた。

最近、我々を含む複数の国内外の研究グループからこれらの疑問を解明する報告が相次いで発表されてきている³⁻⁵⁾。特に、我々は1)TGF- β シグナル(Smad経路)の活性化をモニターで

きるレポーターマウスにおけるルシフェラーゼ活性(図2)2)野生型マウスにおける腸管内でのSmad経路の活性化(Smad2のリン酸化)、3)野生型マウス腸管におけるTGF- β 標的遺伝子(TGF- β 自身、Smad7)の転写活性化の3つを指標にして経口摂取されたTGF- β が生体内で活性を維持しているか否かについて検討した。その結果、組換え型TGF- β (活性型)の投与によって、腸管(特に小腸)において上記いずれのパラメーターの上昇が認められ、経口摂取されたTGF- β はマウス腸管内において活性を保ち機能することが証明された³⁾。

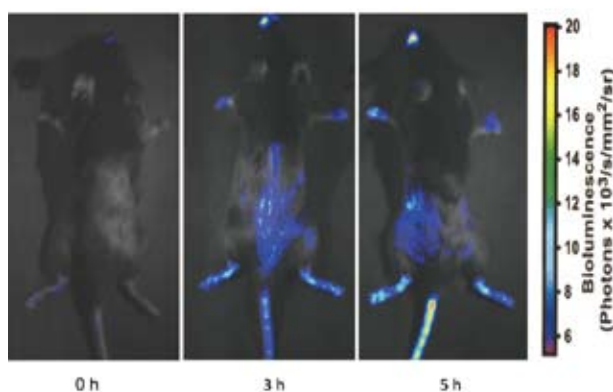


図2 経口摂取されたTGF- β は腸管内で活性を保っているTGF- β シグナルレポーターマウス(SBE-Luciferaseマウス)における(活性型)TGF- β の経口投与後3時間及び5時間後のインビボイメージングによるルシフェラーゼ活性の測定腸管を中心にルシフェラーゼ活性があることを示している。

また、我々は、TGF- β を卵アレルギーと一緒に経口投与することによって卵アレルギーに対する免疫反応(食物アレルギー)が抑制できることをマウスの実験系を用いて見出した³⁾。

以上の結果は、母乳中に含まれるTGF- β タンパク質は、胃酸や消化酵素などの作用を免れ、生体(腸管)内で活性を保ちかつ免疫系に影響を与える(食物タンパク質に対する免疫寛容を誘導する)ことを明らかにし、TGF- β を飲食物などに含有させる(経口摂取させる)ことによって食物アレルギーの発症が予防できる可能性を示唆した。例えば、TGF- β を多く含有する粉ミルクを摂取することによって食物成分に対する乳幼児のアレ

ルギー反応(食物アレルギー)を抑制することが将来、可能になるかもしれない。

ただし、上記のこれまでのマウスを用いた我々の実験では、実験系の単純化のため、経口投与する TGF- β は活性型を用いてきた。しかしながら母乳中(や一部の食品中)の TGF- β は大部分が潜在型として存在する。したがって生体内で潜在型 TGF- β が活性型 TGF- β に変換されるしくみが生体内では存在すると考えられるがそのメカニズムは未だまったく明らかにされていない。このメカニズムの解明は、今後、TGF- β の経口摂取による食物アレルギーをはじめとするアレルギー性疾患の予防法を開発するためには不可欠の基盤となる。

本研究では、アレルギーを予防する粉ミルクの開発などに向けての重要な学術的基礎となる「経口摂取された TGF- β が生体内で活性化される機構」について、試験管内およびマウスの実験系を用いて検討した。その結果、経口摂取された潜在型 TGF- β は生体内で胃酸によって活性化されることを見出した⁶⁾。本研究成果は、“TGF- β を多く含有する粉ミルクの開発”による「経口 TGF- β による乳幼児のアレルギー性疾患予防」という魅力的なコンセプトを具現化するための重要な基礎的知見となる。

2. 実験方法

2-1 試験管内における潜在型 TGF- β の酸による活性化とペプシンに対する抵抗性

試験管内で組み換え型の潜在型 TGF- β を pH1.2 又は pH7.0 の条件下で TGF- β シグナルのレポーター細胞である MFB-F11 細胞と一緒に培養し、上清中に分泌される SEAP 活性を指標として TGF- β シグナル活性をモニターした。一部の実験では、胃液中のタンパク質分解酵素であるペプシンを添加して行った。

2-2 野生型マウスにおける経口的に投与された潜在型 TGF- β の胃酸による活性化

胃酸中和薬剤(シメチジン)をあらかじめ投与した野生型マウス(BALB/c マウス)と非投与(PBS 投与)コントロールマウスのそれぞれに潜在型 TGF- β を(5 μ g/mouse)を経口投与し、経時的にマウス小腸を採取し、腸管内での Smad 経路の活性化(Smad2 のリン酸化)、及び腸管内における TGF- β 標的遺伝子(TGF- β 自身、Smad 7)の転写活性化を指標として TGF- β シグナル活性の活性化の有無について検討した。

2-3 ヒト母乳中潜在型 TGF- β の胃酸による活性化

潜在型 TGF- β を含むヒト母乳を、胃酸中和薬剤(シメチジン)をあらかじめ投与した野生型マウス(BALB/c マウス)と非投与コントロールマウス野生型マウスに2週間連日経口投与し(1200 μ l/mouse/day)マウス小腸を採取し、腸管内での Smad 経路の活性化(Smad2 のリン酸化)、及び腸管内における TGF- β 標的遺伝子(TGF- β 自身、Smad 7)の転写活性化を指標として TGF- β シグナル活性の活性化の有無について検討した。

3. 実験結果

3-1 試験管内における潜在型 TGF- β の酸による活性化とペプシンに対する抵抗性

上記のように、これまでのマウスを用いた我々の実験では、実験系の単純化のため、経口投与する TGF- β は活性型を用いてきた。しかしながら母乳中の TGF- β は大部分が潜在型として存在する。したがって生体内で潜在型 TGF- β が活性型 TGF- β に変換されるしくみが存在すると考えられるがそのメカニズムは未だまったく明らかにされていない。このメカニズムの解明は、今後、TGF- β を多く含む抗アレルギー作用を持つ粉ミルクの開発のためには不可欠である。

in vitro では潜在型 TGF- β を活性型に変えると

き極度の酸性（あるいはアルカリ性）状態にする。これは、タンパク質の立体構造を変化させ、活性型 TGF- β に結合しその活性を阻害している LAP (latency associated peptide) と呼ばれるタンパク質を取り外すためである。

そこで我々は経口摂取された潜在型 TGF- β は生体内で胃の中にある胃酸によって活性型に変換されるという仮説を立て検証した。

試験管内での実験においては、組み換え型の潜在型 TGF- β を pH1.2 又は pH7.0 の条件下で TGF- β シグナルのレポーター細胞である MFB-F11 細胞 (Tesseur I et al. BMC Cell Biol 2006 Mar 20;7:15) と一緒に培養し、上清中に分泌される SEAP 活性を指標として TGF- β シグナル活性をモニターしたところ、pH1.2 の状態で顕著な TGF- β シグナル活性の上昇が認められた。またこの活性は pH7.0 の状態では認められなかった。さらに、これらの実験系に胃液中のタンパク質分解酵素であるペプシンを添加しても、pH1.2 の状態で観察された顕著な TGF- β シグナル活性の上昇には影響しなかった。

3-2 野生型マウスにおける経口的に投与された潜在型 TGF- β の胃酸による活性化

胃酸中和薬剤 (シメチジン) をあらかじめ投与し胃酸を中和しておいた野生型マウス (BALB/c マウス) と非投与コントロールマウスのそれぞれに潜在型 TGF- β ($5\mu\text{g}/\text{mouse}$) を経口投与したところ、投与後 3 時間目にマウス小腸を採取し、腸管内での Smad 経路の活性化 (Smad2 のリン酸化) を検討したところ小腸上皮細胞におけるリン酸化 Smad2 陽性細胞数の増加が観察された (図 3)。またマウス小腸における TGF- β 標的遺伝子 (TGF- β 自身、Smad7) の転写レベルの上昇も認められた。

3-3 ヒト母乳中潜在型 TGF- β の胃酸による活性化

潜在型 TGF- β を含むヒト母乳を、胃酸中和薬剤 (シメチジン) をあらかじめ投与した野生型マウス (BALB/c マウス) と非投与コントロールマウス野生型マウスに 2 週間連日経口投与し ($1200\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{day}$) マウス小腸を採取し、腸管内での Smad 経路の活性化 (Smad2 のリン酸化)、及

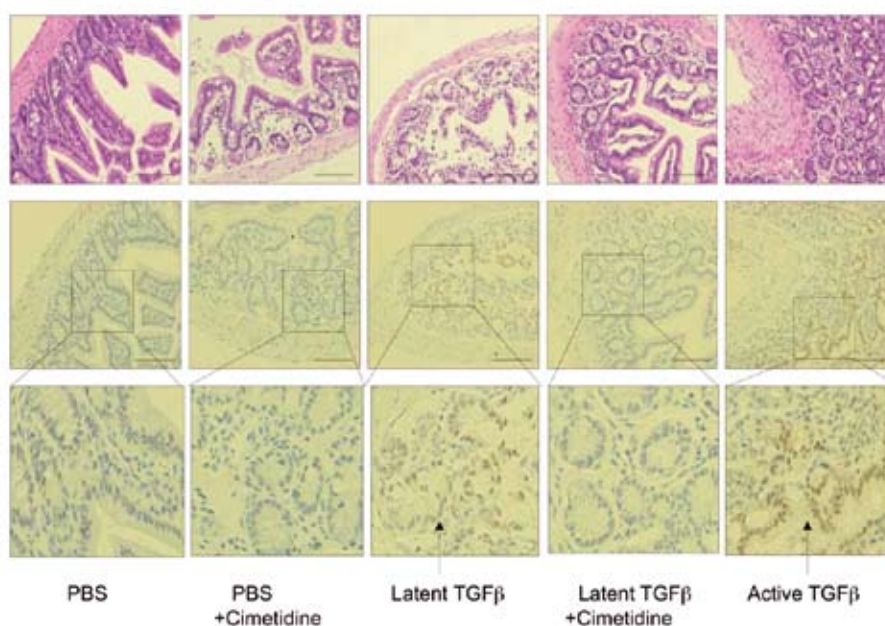


図 3 経口投与された組み換え型の潜在型 TGF- β は胃酸によって活性化される

野生型マウスに組み換え型の潜在型 TGF- β (latent TGF β) または活性型 TGF- β (Active TGF β) (ポジティブコントロール) を胃酸分泌阻害剤 (cimetidine) の存在下あるいは非存在下に投与したあと、小腸における TGF- β シグナルの活性化をリン酸化 Smad2 の免疫染色法によって評価した。cimetidine 投与によってリン酸化 Smad2 の染色 (茶色) が消失していることがわかる。

び腸管内における TGF- β 標的遺伝子 (TGF- β 自身、Smad7) の転写活性化を指標として TGF- β シグナル活性の活性化の有無について検討した。

その結果 2) の結果と同様に、投与終了後 3 時間目にマウス小腸を採取し、腸管内での Smad 経路の活性化 (Smad2 のリン酸化) を検討したところ小腸上皮細胞におけるリン酸化 Smad2 陽性細胞数の増加が観察され、またマウス小腸における TGF- β 標的遺伝子 (TGF- β 自身、Smad7) の転写レベルの上昇も認められた (図 4)。

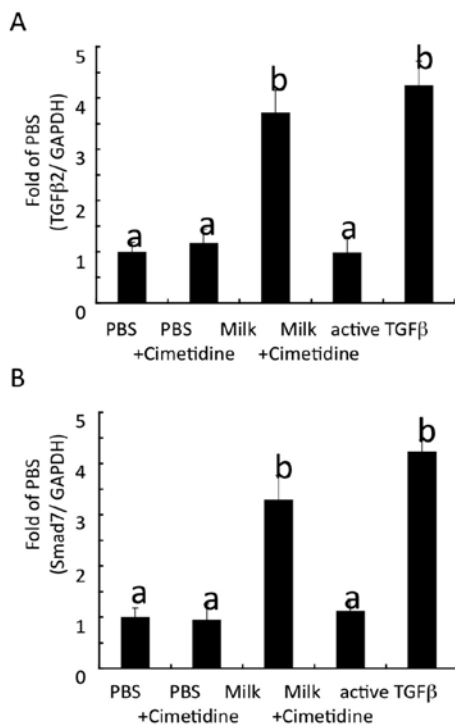


図 4 ヒト母乳中潜在型 TGF- β の胃酸による活性化

潜在型 TGF- β を含むヒト母乳を、胃酸中和薬剤(シメチジン)をあらかじめ投与した野生型マウス (BALB/c マウス) と非投与コントロールマウス野生型マウスに 2 週間連日経口投与し (1200 μ l/mouse/day) マウス小腸を採取し、腸管内での TGF- β 標的遺伝子 (TGF- β 2、Smad7) の転写活性化を検討した。その結果、マウス小腸における TGF- β 標的遺伝子 (TGF- β 2、Smad7) の転写レベルが母乳投与群においてコントロール群と比して上昇していた。

4. 考 察

以上の試験管内及びマウスを用いた検討の結果は、TGF- β (潜在型) が、酸や胃内の消化酵素 (ペプシンなど) に比較的耐性のタンパク質であり、かつ胃酸によって活性化型に変換することを示唆し

た。これらの結果は、緒言に記述した経口摂取された TGF- β が腸管内で機能するという実験結果 (図 1 参照) と一致する。おそらく母乳中に含まれる潜在型 TGF- β は胃酸によって活性化され、小腸においてその活性が発揮され食物タンパク質に対する免疫寛容の誘導に寄与しているものと考えられた。本研究成果は文献⁶⁾に公表したので詳細は原著にあたっていただくと幸いである。

試験管内における潜在型 TGF- β の酸性条件下による活性化の検討は、2-4 時間の incubation time で行われた。我々は、結果には示していないがより長時間による潜在型 TGF- β の酸性条件下での活性化の検討およびペプシン存在下での検討では、潜在型 TGF- β の分解およびその活性の低下を認めている。したがって、TGF- β (潜在型) が、酸や胃内の消化酵素 (ペプシンなど) に比較的耐性のタンパク質であって、まったく分解されないというわけではない。

組み換え型の潜在型 TGF- β の投与と比べて、ヒト母乳の投与は 2 週間行われた。したがって胃酸による活性化後の組み換え型の潜在型 TGF- β の小腸における TGF- β 活性は直接的な作用である可能性が高いが、母乳のそれは、2 週間の投与期間の間に起った様々な生物学的変化による二次的なものである可能性は現時点では否定できない。

母乳中の潜在型 TGF- β の濃度は比較的低いため、我々はたった一回の投与では、組み換え型の潜在型 TGF- β の投与のときのような生物活性を小腸において検出することは困難であった。

胃酸は、これまで消化機能における役割のみが注目されてきた。しかしながら、本知見は、胃酸の新しい役割 (経口的に摂取された生理活性分子の活性化) にも言及した興味深いものである。実際、胃酸中和剤を長期に投与されている胃潰瘍患者さんにおいては食物タンパク質に対する IgE 抗体の上昇が認められるという報告もあり、今後

ヒトにおけるこのような検討(胃酸中和剤投与患者さんにおける食物アレルギーへの成り易さの有無)が必要かもしれない。

経口的に摂取された TGF- β による抗アレルギー作用については、米国、豪州の研究者からも報告がなされ現在非常に注目されている²⁾⁴⁾。本研究成果を含め、これまでの我々や諸外国の研究者の研究成果をもとに、最近我々は「経口 TGF- β による乳幼児のアレルギー性疾患予防」という魅力的なコンセプトを英国アレルギー学会誌において提唱した⁷⁾。さらなる基礎的な検討およびヒトにおけるさまざまな臨床的検討が今後にも必要であることはいうまでもないが、我々は今後も、経口 TGF- β によるアレルギー予防に関するより詳細な免疫学的メカニズムを明らかにして、このようなコンセプトを、“TGF- β を多く含有する粉ミルクの開発” のような形で具現化し、人類の福祉、健康の維持およびその発展に貢献したいと考えている(図5)。



図5 経口 TGF- β による食物アレルギーなどのアレルギー性疾患の予防(写真は食物アレルギーを合併したアトピー性皮膚炎の乳児)

TGF- β を多く含む粉ミルクなどを開発することによって乳幼児が TGF- β を多く摂取すれば食物アレルギーなどのアレルギー疾患の発症を乳幼児期に減らすことができるかもしれない。

謝辞

本研究に対して多大なご助成を賜りました財団法人浦上食品食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また研究遂行にご協力いただきました山梨大学医学部免疫学講座および順天堂大学医学部アトピー疾患研究センターの方々とりわけ中村勇規氏、大沼裕子氏、原むつ子氏、奥村康教授、小川秀興教授に深く感謝いたします。

文献

- 1) Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., and Mori, T.: Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *J. Biochem.*, 147, 781-792 (2010).
- 2) Oddy, WH., and Rosales, FA.: A systematic review of the importance of milk TGF- β on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 21, 47-59 (2009).
- 3) Ando, T., Hatsushika, K., Wako, M., Ohba, T., Koyama, K., Ohnuma, Y., Katoh, R., Ogawa, H., Okumura, K., Luo, J., Wyss-Coray, T., and Nakao, A.: Orally administered TGF- β is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 120, 916-923 (2007).
- 4) Verhasselt, V., Milcent, V., Cazareth, J., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., and Julia, V.: Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat. Med.*, 14, 170-180 (2008).
- 5) Okamoto, A., Kawamura, T., Kanbe, K., Kanamaru, Y., Ogawa, H., Okumura, K., and Nakao, A.: Suppression of serum IgE response and systemic anaphylaxis in a food allergy model by orally administered high-dose TGF- β . *Int. Immunol.*, 17, 705-712 (2005).
- 6) Nakamura, Y., Miyata, M., Ando, T., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., Ogawa, H., Okumura, K., and Nakao, A.: The latent form of transforming growth factor- β administered orally is activated by gastric acid in mice. *J. Nutr.*, 139, 1463-1468 (2009).
- 7) Nakao, A.: The role and potential use of oral TGF- β in the prevention of infant allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 40, 725-730 (2010).

The latent form of TGF- β administered orally is activated by gastric acid in mice

Atsuhito Nakao

*Department of Immunology, Faculty of Medicine
University of Yamanashi*

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a regulatory cytokine with a pleiotropic role in immune responses. TGF- β is secreted in a latent complex in which TGF- β homodimers are non-covalently associated with homodimers of the pro-peptide called the latency-associated peptide (LAP). The release of TGF- β from its LAP is required for the binding of TGF- β to the cellular receptors and subsequent activation (phosphorylation) of intracellular signaling mediators of Smad2 and Smad3. Extensive work on the activation of latent TGF- β led to two classes of putative TGF- β activators which liberate TGF- β from the constraints of LAP through either conformational change or LAP proteolysis. For example, extremely low or high pH activates latent TGF- β by altering the structure of LAP whereas certain proteases activate latent TGF- β through proteolytic digestion of LAP. In contrast, the mechanisms involved in latent TGF- β activation *in vivo* are still only partially understood.

Human milk contains a significant amount of the latent form of TGF- β . The human-milk borne TGF- β is thought to play a role in the development of both the intestinal barrier function and mucosal immunity. However, it is unclear how the latent TGF- β in human milk is converted into the active one *in vivo* to mediate its activity.

This study showed that recombinant human latent TGF- β or human milk-borne latent TGF- β increased Smad-responsive promoter activity in MFB-F11 reporter cells at pH 1.2, but not at pH 7.0, regardless of the presence or absence of the gastric protease pepsin. In addition, mice treated orally with latent TGF- β (5 μ g/mouse) showed significant increases in the phosphorylation of Smad2 and TGF- β and Smad7 mRNA expression in the small intestine, which was inhibited by cimetidine (100 mg/kg, i.p.), an antagonist of histamine H₂-receptors. Similarly, mice treated orally with 1200 μ L of human milk containing latent TGF- β (3 μ g/L) daily for 2 weeks increased TGF- β and Smad7 mRNA expression in the small intestine, and this expression was also inhibited by the anti-acid treatment. Therefore, the latent form of TGF- β , such as TGF- β in human milk, can be activated by gastric acid following oral administration in mice. This process may therefore be involved in the conversion of human milk-borne latent TGF- β to the active form *in vivo*. Given a potential role of human milk TGF- β in the prevention of allergic diseases during infancy, these findings might be also useful to develop infant formula maintaining TGF- β activity for reducing the prevalence of allergic diseases in neonates and infants.